

AF

⑯



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑯ Veröffentlichungsnummer:

0 159 311
A1

⑯

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

HETVER
VIR-INA
ELUPR
HEAT

⑯

Anmeldenummer: 85890044.2

⑯ Int. Cl. 4: A 61 L 2/04
//A61K35/16

⑯ Anmeldetag: 18.02.85

VO-TEUCHIT E

⑯ Priorität: 09.03.84-AT 792/84
11.10.84 AT 3237/84

⑯ Erfinder: Wöber, Günter, Prof. Dr.
Carolusstrasse 23
A-2522 Oberwaltersdorf(AT)

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
23.10.85 Patentblatt 85/43

⑯ Erfinder: Philipitsch, Anton
Hans Kudlichgasse 5
A-2490 Ebenfurt(AT)

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

⑯ Erfinder: Linnau, Yendra, Dr.
Lavendelweg 24
A-1224 Wien(AT)

⑯ Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für
chemisch-medizinische Produkte
Industriestrasse 72
A-1220 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Dorner, Friedrich, Prof. Dr.
Peterlinigasse 17
A-1230 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Eibl, Johann, Dr.
Gustav Tschermarkgasse 2
A-1180 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Trambauer, Karl, Ing.
Steudelgasse 37-39/1/8
A-1100 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Schwarz, Otto, Dr.
Celesgasse 5
A-1190 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Frechinger, Wolfgang
Nordmanngasse 22
A-1210 Wien(AT)

⑯ Erfinder: Elsinger, Fritz, Dr.
Eduard Kleingasse 29
A-1130 Wien(AT)

⑯ Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.
Schwindgasse 7 P.O. Box 205
A-1041 Wien(AT)

⑯ Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten.

⑯ Es wird ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in Blutprodukten beschrieben, wobei die Blutprodukte in feuchtem oder in festem Zustand in Gegenwart von anorganischen oder organischen hydroxylgruppenhaltigen Verbindungen mit einer H⁺-Dissoziationskonstante vor <10⁻¹¹ in einer Konzentration von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%) hitzebehandelt werden. Als hydroxylgruppenhaltige Verbindungen sind Wasser, Methanol, Äthanol oder Mannit beschrieben. Die Temperatur kann bis zu 121°C, die Dauer der Hitzebehandlung 1 s bis 100 h betragen.

Das beschriebene Inaktivierungsverfahren kann angewendet werden zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma, wobei durch die Inaktivierung etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrierbare Krankheitserreger unschädlich gemacht werden.

A1

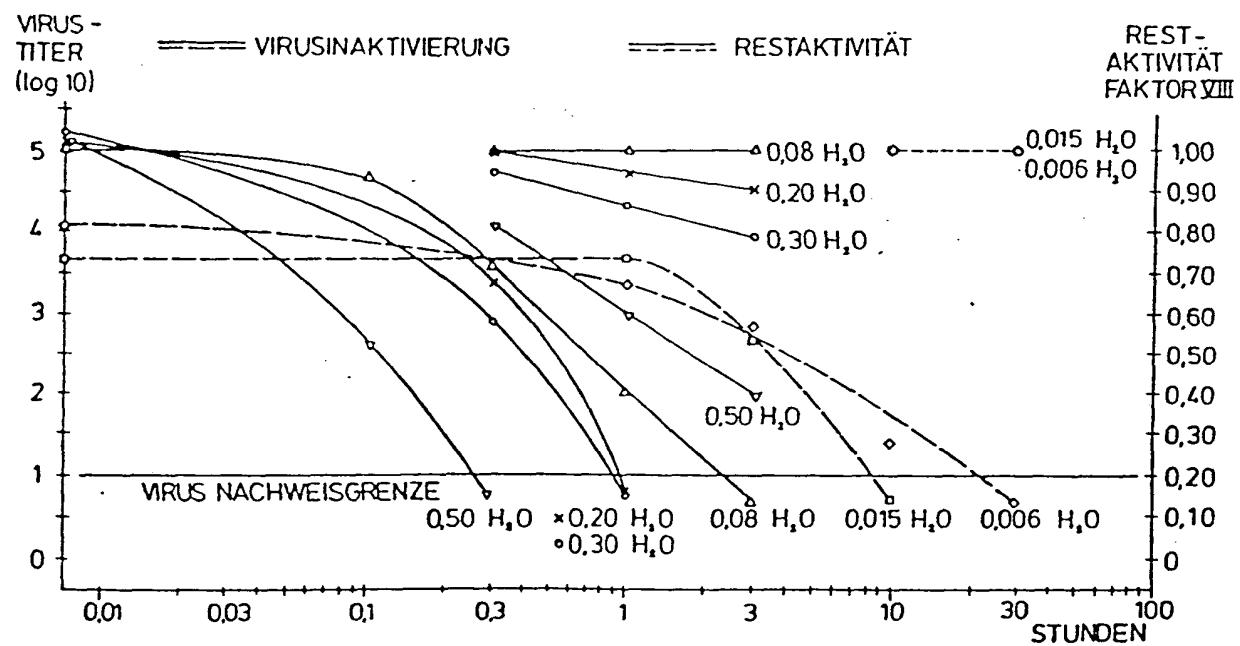
159 311

EP 0 159

// A 61L2/00 P2 E, 2/04)

1...

FIG. 1 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (SINOBIS-VIRUS) UND RESTAKTIVITÄT VON FAKTOR VIII BEIM ERHITZEN EINER FAKTOR VIII - PRÄPARATION AUF 60°C



Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filterbaren Krankheitserregern in Blutprodukten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filterbaren Krankheitserregern, insbesondere Hepatitisviren und unbekannten Erregern, die eventuell AIDS (acquired immune deficiency syndrome) 5 übertragen können, in Blutprodukten unter Anwendung erhöhter Temperatur sowie ein Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten unter Anwendung dieses Verfahrens.

Unter Blutprodukten werden Produkte aus menschlichem oder 10 tierischem Blut bzw. Plasma verstanden, die zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung bestimmt sind. Solche Produkte können Enzyme, Proenzyme einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, 15 Immunglobuline, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma enthalten.

Es ist eine umfangreiche Literatur vorhanden, die sich mit der Hitzeinaktivierung von vermehrungsfähigen filterbaren Krankheitserregern in Blutprodukten befaßt. 20

Die verschiedenen Verfahren umfassen:

- Erhitzen der Blutprodukte in wässriger Lösung, gegebenenfalls unter Zusatz viruzider Substanzen,
- Erhitzen der Blutprodukte in wässriger Lösung in Anwesenheit von Stabilisatoren,
- Behandeln der Blutprodukte mit organischen Lösungsmitteln,
- Bestrahlen der Blutprodukte in festem Zustand,
- Erhitzen der Blutprodukte in trockenem Zustand.

Das Bestreben bei allen diesen Inaktivierungsverfahren geht dahin, die potentielle Infektivität der Präparationen aufzuheben, ihre biologische Aktivität aber weitgehend zu erhalten. Dieses Ziel konnte jedoch bisher nur bei 5 Albuminpräparationen erreicht werden, u.zw. durch Erhitzen von wässrigen Albuminlösungen bei einer Temperatur von 60°C während 10 h, da Albumin wesentlich stabiler gegenüber Hitzeeinwirkung ist als alle anderen Blutproteine.

10

Im einzelnen sind zum Stand der Technik beispielsweise die folgenden Literaturstellen anzuführen:

15 Die DE-OS 29 16 711 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Gerinnungsfaktoren enthaltenden Präparationen in wässriger Lösung unter Anwendung einer Temperatur von 30 bis 100°C, wobei der Lösung der Gerinnungsfaktoren eine Aminosäure und ein Mono-, Oligosaccharid oder Zuckeralkohol zugesetzt werden.

20

25 Die EP-A2 - 0 053 338 beschreibt ein Verfahren zur Inaktivierung von Hepatitis-Viren in Faktor IX und X enthaltenden Präparationen, wobei eine Erwärmung der wässrigen Lösung eines Blutpräparates in Gegenwart von Calciumionen und gegebenenfalls einer Aminosäure und/oder eines Saccharides oder Zuckeralkoholes bei Temperaturen von bis zu 100°C vorgenommen wird.

30

In der EP-A2 - 0 035 204 wird ein Verfahren zur Inaktivierung von wässrigen Proteinlösungen, die Faktor VIII, Fibronectin, Globulin, Fibrinogen und andere Proteine enthalten können, beschrieben, wobei die Komposition mit einem Polyol gemischt und die Mischung auf eine Temperatur von 60 bis 75°C erhitzt wird.

35

In der EP-A2 - 0 052 827 ist ein Verfahren zur Inakti-

vierung von Hepatitis-Viren in einer wässerigen, die Faktoren II und VII enthaltenden Lösung in Anwesenheit eines Chelatbildners und gegebenenfalls einer Aminosäure und/oder eines Saccharides oder Zuckeralkoholes beschrieben.

In der US-A - 4,379,085 ist ein Verfahren zur Hitzeaktivierung eines Plasmaproteins, wie C₁-Inhibitor oder Faktor IX, in wässriger Lösung in Gegenwart von Kalium- oder Ammoniumcitrat beschrieben.

In der EP-A2 - 0 077 870 ist ein Inaktivierungsverfahren beschrieben, bei welchem eine wässrige, Faktor VIII enthaltende Lösung mit Aminosäuren, Monosacchariden, Oligosacchariden, Zuckeralkoholen und Kohlenwasserstoff- oder Hydroxylkohlenwasserstoffcarbonsäuren mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen auf eine Temperatur von 50 bis 80°C erhitzt wird.

In der PCT-Anmeldung WO 83/04371 ist ein Verfahren zum Inaktivieren von Hepatitis-Viren beschrieben, wobei eine das Virus enthaltende Präparation bei einer Temperatur von 4 bis 40°C mit einem Halogenkohlenwasserstoff, insbesondere Chloroform, behandelt wird.

Die EP-Bl - 0 015 055 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung eines Blutproduktes, wobei das Produkt in wasserfreiem Zustand einer Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt wird, um vorhandene Mikroorganismen zu inaktivieren.

Rosenberg et al. beschreiben in einer Abhandlung des XII. International Congress on Blood Transfusion, Abstracts, "MIR" Publishers, Moscow 1969, pp. 473-475 ein Verfahren zur Inaktivierung von albuminhältigen Präparationen und Fibrinogen in trockenem Zustand durch 10-stündiges Erhitzen auf 60°C.

Die EP-A2 - 0 094 611 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung einer Faktor VIII enthaltenden Komposition im trockenen Zustand mit weniger als 5 Gew.% (0,05) Wasser, unter Anwendung einer Temperatur von wenigstens 60°C zwecks 5 Inaktivierung von vorhandenen Hepatitis-Viren.

Die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 82/03871 beschreibt ein Verfahren zur Behandlung von Blutgerinnungsenzyme enthaltenden Zubereitungen, wobei diese zur Inaktivierung 10 vorhandener infektiöser Viren im trockenen Zustand erhitzt werden; als trockener Zustand wird ein solcher mit weniger als 5 Gew.% (0,05) Wasser definiert.

Wie aus der vorhergehenden Übersicht hervorgeht, sind 15 sowohl Verfahren bekannt, bei denen die zu behandelnde, Blutproteine enthaltende Präparation in wässriger Lösung oder in einem organischen Lösungsmittel suspendiert vorliegt, als auch Verfahren, bei denen die Präparation in trockenem Zustand, z.B. lyophilisiert, der Inaktivierungs- 20 behandlung unterworfen wird. Trotz aller bisherigen Anstrengungen ist es bisher nicht gelungen, eine Inaktivierungsmethode zu entwickeln, die - vergleichbar mit der Inaktivierung des Blutproduktes Albumin - gleichermaßen eine Sicherheit gegen Übertragung von Hepatitis-Viren 25 und anderen pathogenen Viren gewährleistet und die Erhaltung der biologischen Aktivität des jeweiligen Blutproduktes sicherstellt. Seit 30 Jahren werden albuminhältige Lösungen, die in Anwesenheit von geeigneten Stabilisatoren 10 h auf 60°C erhitzt worden sind, millionenfach klinisch 30 angewandt, ohne daß dadurch Infektionserkrankungen übertragen worden wären. Wie in Experimenten mit Schimpansen gezeigt werden konnte, werden Hepatitis-Viren, die albuminhältigen Lösungen zugesetzt wurden, durch Erhitzen dieser Lösungen auf 60°C während 10 h vollständig inaktiviert. 35

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Inaktivierungsverfahren zu schaffen, das bei Erhaltung der biologischen Aktivität des zu behandelnden Blutproduktes eine zuverlässige Sicherheit gegenüber Viren, insbesondere Hepatitis-5 Viren, erzielt, die der bei der Inaktivierung von albuminhältigen Lösungen erreichbaren Effizienz gleichwertig oder sogar überlegen ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß bei einem Verfahren 10 der eingangs beschriebenen Art dadurch gelöst, daß die Blutprodukte in feuchtem oder in festem Zustand in Gegenwart von anorganischen oder organischen hydroxylgruppen-hältigen Verbindungen mit einer H^+ -Dissoziationskonstante von $<10^{-11}$ bei einer Temperatur im Bereich bis zu 121°C hitze-15 behandelt werden, wobei die Konzentration der hydroxylgruppen-hältigen Verbindungen größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%) ist. Der zulässige Wasser-gehalt ist zum Teil vom Blutprodukt, welches der Behandlung unterzogen wird, abhängig; jedenfalls muß der feste Zustand 20 des Produktes erhalten bleiben, d.h. eine flüssige Kon-sistenz vermieden werden.

Da die notwendigen Untersuchungen über Hepatitis-Virus-25 inaktivierung in Blutprodukten nicht sofort beim Menschen vorgenommen werden können und Schimpansen nur in unge-nügender Zahl zur Verfügung stehen, erfolgt erfindungs-gemäß die Bewertung der Wirksamkeit der Inaktivierung 30 mit Hilfe von Modellviren. Am Beispiel von Hundehepatitis-virus als Modellvirus konnte gezeigt werden, daß die ein-gangs erwähnten bekannten Verfahren zur Virusinaktivierung von Blutprodukten dem Inaktivierungsverfahren in Albumin weit unterlegen sind. So wird z.B. Hundehepatitisvirus 35 in Proteinlösungen in Anwesenheit von 0,50 Saccharose und 2M Glycin als Stabilisatoren nicht inaktiviert; eben-so nicht in Faktor VIII-Präparationen in trockenem Zu-stand bei Erhitzen auf 60°C während 10 h. Hundehepatitis-

viren werden jedoch in Albuminlösungen bei Erhitzung auf 60°C während 10 h vollständig inaktiviert. Das gleiche gilt für E. Coli Bakteriophagen T4.

5 Bei der Bewertung des erfindungsgemäßen Verfahrens hat sich gezeigt, daß Hundehepatitisvirus und andere Modellviren vollständig inaktiviert werden. Die Inaktivierungs geschwindigkeit von E. Coli Bakteriophagen T4 in beliebi gen Blutprodukten in Anwesenheit der erfindungsgemäß wirk-
10 10 samen Menge an hydroxylgruppenhältigen Verbindungen ist sogar größer als in einer auf 60°C erhitzten Albuminlösung.

Die Dauer der erfindungsgemäßen Hitzebehandlung kann in weiten Grenzen variiert werden, je nach der angewandten
15 Temperatur und der Art bzw. Hitzeempfindlichkeit der zu behandelnden Blutprodukte. Sie kann zwischen 1 s und 100 h betragen.

Als hydroxylgruppenhältige Verbindungen mit einer H⁺-
20 Dissoziationskonstante von <10⁻¹¹, die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, kommen insbesondere Wasser, Methanol, Äthanol oder Mannit in Betracht, wobei die Kon zentration dieser Verbindungen vorzugsweise 0,05 bis 0,40 beträgt. Die H⁺-Dissoziationskonstante von Wasser beträgt
25 10⁻¹⁴, die von Methanol 10⁻¹⁵, von Äthanol 10⁻¹⁵ und von Mannit weniger als 10⁻¹⁷.

Bei Verwendung von Wasser besteht eine bevorzugte Aus führungsform der Erfindung darin, daß die Hitzebehandlung
30 an Präparationen, die 0,06 bis 0,30 Wasser enthalten, bei einer Temperatur von 50 bis 90°C durchgeführt wird. Weiters hat es sich als sehr günstig erwiesen, daß die Hitzebehandlung der Blutprodukte in Gegenwart eines sauer stofffreien inerten Schutzgases, vorzugsweise Stickstoff
35 und allenfalls in Gegenwart von sauerstoffbindenden Sub stanzen durchgeführt wird. Bei der Ausführungsform mit Schutzgas hat sich herausgestellt, daß die Restaktiviti-

täten bzw. Ausbeuten der Blutprodukte, insbesondere von Gerinnungsfaktoren, wesentlich höher sind als beim Erhitzen in sauerstoffhäliger Atmosphäre, während die Virusaktivierung hinsichtlich Ausmaß und Geschwindigkeit 5 gleich hoch ist.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch darin bestehen, daß die Blutprodukte in einem flüssigen Medium, in dem sie unlöslich 10 sind, hitzebehandelt werden. Als flüssiges Medium kann Chloroform oder Essigsäureäthylester verwendet werden.

Nach einer abgeänderten Ausführungsform werden die Blutprodukte mit hydroxylgruppenhältigen gasförmigen Verbindungen behandelt, mit der Maßgabe, daß in den Blutprodukten die Konzentration der hydroxylgruppenhältigen Verbindungen von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als 0,40 (40 Gew.%) erreicht wird. Im Rahmen dieser Ausführungsform können 20 z.B. die Blutprodukte in festem Zustand mit Wasserdampf von einem Druck bzw. Partialdruck zwischen 0,1 und 2 bar behandelt werden.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren läßt sich 25 mit Vorteil bei einem Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließen.

lich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma oder Mischungen einzelner Blutprodukte anwenden, wobei die Inaktivierung in einer beliebigen Stufe des Herstellungsverfahrens vorgenommen wird, worauf gegebenenfalls die Blutprodukte in eine galenische Zubereitung übergeführt werden.

In den Rahmen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens fällt auch die Arbeitsweise, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches kovalent an eine wasserunlösliche Matrix gebunden ist. Beispielsweise kann Immunglobulin an Sepharose immobilisiert und der Inaktivierung unterworfen werden. Andererseits ist es möglich, daß ein Blutprodukt auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, nicht kovalent adsorbiert und hitzebehandelt wird. Eine besondere Ausführungsform bei der Herstellung einer fibrinogen-hältigen Präparation besteht darin, daß auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, eine fibrinogen-hältige Komposition aufgebracht und hitzeinaktiviert wird.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens können auch weitere Fraktionierungsmaßnahmen angewendet werden, um die hitzeinaktivierten Blutprodukte von während der Hitzeinaktivierung allenfalls gebildeten Neoproteinen oder Neoantigenen zu befreien.

Das erfindungsgemäße Inaktivierungsverfahren sowie die Herstellung von Blutprodukten unter Anwendung des Verfahrens, die erreichten Wirkungen und die Überlegenheit gegenüber bekannten Verfahren ist in den folgenden Beispielen und Tabellen näher erläutert.

35 Beispiel 1:

a) Herstellung einer Faktor VIII-Präparation

6660 ml frisch gefrorenes Plasma wurde bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 700 ml Trinatriumcitrat-Lösung, die 0,05 mg Natriumpentosansulfat pro ml und 5 30 Einheiten Aprotinin pro ml enthielt, gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen.

10 Durch Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 0,03 wurde die Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst.

15 b) Inaktivierung eines Modellvirus

Die in beschriebener Weise erhaltene Faktor VIII-hältige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt, mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit 20 virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde auf verschiedene Wassergehalte, u.zw. auf 0,08, auf 0,20, auf 0,30 und auf 0,50 eingestellt und in geschlossenen Behältern bei einer Temperatur von 60°C bzw. 80°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung 25 des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

30 Die Bestimmung des Virustiters wurde in folgender Weise durchgeführt:

Das Faktor VIII enthaltende Lyophilisat wurde in Wasser gelöst und mit isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis 35 1 : 10 seriell verdünnt. Der Titer des Sindbis-Virus wurde durch Bewertung des zytopathischen Effektes auf

sensitive Vero-Zellen in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach statistischer Behandlung der Auswertung entsprechend der Formel von Reed und Muench als Logarithmus $TCID_{50}$ ausgedrückt (Reed J.L. and H. Muench; 5 Amer.J.Hyg. 27, 493, 1938).

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Restaktivität an Faktor VIII erfolgte 10 mit Hilfe des Thromboplastin-Bildungs-Tests (2-Stufen-Test). Die Faktor VIII-Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor VIII-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor VIII-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

15

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde vor und nach 20 der Hitzebehandlung mit wasserfreiem Methanol extrahiert. Der Wassergehalt der Methanolösung wurde nach Karl Fischer in einem Titrator nach dem coulometrischen Verfahren bestimmt (Scholz, E.; Fresenius' Z. anal. Chem. 314, 567-571, 1983).

25 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle I zu entnehmen, woraus sich deutlich ergibt, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit vom Wassergehalt abhängig ist. Während bei der Anwendung von 30 einer Temperatur von 60°C die Nachweisgrenze des Virus bei einem Wassergehalt von 0,08 nach 3 h erreicht wird, wird diese Grenze bei einem Wassergehalt von 0,20 und 0,30 schon nach einer Stunde und bei einem Wassergehalt von 0,50 schon nach 0,3 h erreicht. Der Inaktivierungseffekt 35 ist auch von der Temperatur abhängig. Bei einer Temperatur von 80°C und einem Wassergehalt von 0,08 wird die Nachweisgrenze des Virus schon nach 0,3 h erreicht.

Die Restaktivität nach der Inaktivierungsbehandlung war bei allen Proben mit einem Wassergehalt bis zu 0,30 mit mindestens 0,80 (80 %) zufriedenstellend, selbst bei einem Wassergehalt von 0,50 betrug die Restaktivität nach 3 h bei 60°C noch 0,38 (38 %).

5 Im Vergleich dazu wurden Faktor VIII-Konzentrate, die in gleicher Weise wie oben beschrieben hergestellt worden waren, in "trockenem Zustand" behandelt, d.h. mit einem nach dem Stand der Technik dem "trockenen Zustand" zugeordneten Wassergehalt von weniger als 0,05 Wasser. Die

10 Ergebnisse sind in der Tabelle I a) angegeben, woraus zu ersehen ist, daß bei dem niedrigen Wassergehalt, der dem "trockenen Zustand" entspricht, die Nachweisgrenze des Virus bei einem Wassergehalt von 0,015 erst nach 10 h, bei einem Wassergehalt von 0,006 erst nach 30 h

15 erreicht wird. Daraus ergibt sich, daß das erfindungsgemäße Verfahren 10- bis 100-fach wirksamer ist bei der Verminderung eines Virustiters um 3 bis 4 Zehnerpotenzen.

20 Diese Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem Stand der Technik ergibt sich anschaulich auch aus den Virusinaktivierungskurven in Fig. 1 der Zeichnung, wobei die voll ausgezogenen Kurven die erfindungsgemäße Inaktivierung bei 0,50, 0,30, 0,20 bzw. 0,08 H₂O und die strichliert gezeichneten Kurven den Virustiterabfall in "trockenem Zustand" von 0,015 H₂O und 0,006 H₂O anschaulichen. Auf der Abszisse der Fig. 1 ist die Zeitdauer der Behandlung in Stunden im logarithmischen Maßstab angegeben, auf der Ordinate der Virustiter im logarithmischen Maßstab. Zusätzlich ist in Fig. 1 der Verlauf der Restaktivität angegeben, wobei die voll ausgezogenen Kurven für den erfindungsgemäßen Wassergehalt und die strichlierten Kurven für den Restaktivitätsverlauf in trockenem Zustand stehen.

25 30 35 Beispiel 2:
Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellte Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virus-

suspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde in Gegenwart von Methanol bei einer Temperatur von 60°C der Inaktivierungs-
5 behandlung unterworfen. Eine weitere Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit Mannit versetzt, gefriergetrocknet und ebenfalls bei 60°C hitzeinaktiviert.
Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter sind aus den Tabellen II und III zu entnehmen, wobei in
10 den Tabellen IIa und IIIa die Vergleichsergebnisse ohne den erfindungsgemäßen Gehalt an hydroxylgruppenhältigen Verbindungen angegeben sind. Wieder ist die Überlegenheit der erfindungsgemäßen Arbeitsweise deutlich, indem bei dieser die Inaktivierungsgeschwindigkeit des Modellvirus
15 bei Erhaltung der Restaktivität wesentlich größer ist.

Beispiel 3:

a) Herstellung einer den partiellen Prothrombinkomplex enthaltenden Präparation:

20 Eine die Gerinnungsfaktoren II, IX und X enthaltende Präparation wurde nach der in Vox. Sang. 33, 37 - 50 (1977) beschriebenen Methode aus menschlichem Plasma durch Adsorption an DEAE-Sephadex, Waschen des Ionenaustauschers und Elution des Komplexes gewonnen.
25

b) Inaktivierung eines Modellvirus

30 Das Eluat wurde dialysiert, gefriergetrocknet und daraus eine wässrige Lösung des partiellen Prothrombinkomplexes mit einem Gehalt von 50 mg Protein/ml bereitet. Die Lösung wurde mit einer Suspension des Bakteriophagen T4 in Kulturmedium für Escherichia coli 11303 bzw. mit virusfreiem Kulturmedium versetzt und gefriergetrocknet.
35 Das gefrierge-

tröcknete Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,09 eingestellt. Geschlossene Behälter mit gefriergetrockneten partiellen Prothrombinkomplex-Proben - mit und ohne Virus - wurden bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

10

Die Bestimmung des Virustiters wurde in folgender Weise durchgeführt:

Das den partiellen Prothrombinkomplex enthaltende Lyophilisat wurde nach der Hitzebehandlung in Wasser gelöst und mit 1 mM $MgCl_2$ im Verhältnis 1 : 10 seriell verdünnt. Eine Mischung von 3 ml 0,7 % Bacto-Agar, 43 bis 45°C, 100 μ l Suspension von *E. coli* in Flüssigmedium und 200 μ l der bakteriophagenhältigen Probe bzw. Verdünnung wurden durchgemischt und rasch auf einer Nähragarplatte (ATCC 129) ausgegossen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mit Hilfe eines Zählgerätes die durch vermehrungsfähige Viruspartikel erzeugten Plaques im konfluenten Zellrasen gezählt (PFU, plaque-forming units).
25 Die Ergebnisse wurden als \log_{10} PFU ausgedrückt.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Faktor IX-Aktivität erfolgte durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor IX-Mangelplasma und Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die Faktor IX-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor IX-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor IX-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle IV zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus schon nach kurzer Zeit 10 - weniger als 1 h - erreicht wurde, wobei die Restaktivität voll erhalten blieb. Im Vergleich dazu ist aus der Tabelle IVa zu ersehen, daß bei einer Hitzebehandlung partieller Prothrombinkomplex-Präparationen in "trockenem Zustand" bei einem Wassergehalt von 0,004 selbst nach zehn- 15 stündiger Behandlung der Virustiter mit 2,0 noch relativ hoch war, sogar bei Anwendung von höheren Temperaturen von 80 und 90°C.

20 Die Virusinaktivierungskurven und der Verlauf der Restaktivitäten nach diesem Beispiel sind in Fig. 2 in gleicher Weise wie in Fig. 1 veranschaulicht mit voll ausgezogenen Linien dargestellt, wogegen die nach dem Stand der Technik im trockenen Zustand erhaltenen Kurven strichliert angegeben sind.

25

Beispiel 4:

a) Herstellung einer den totalen Prothrombinkomplex enthaltenden Präparation

30 Eine den Gerinnungsfaktor VII enthaltende Präparation wurde nach der in der AT-PS 359.646 beschriebenen Methode aus menschlichem Zitratplasma hergestellt. Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und einer DEAE-Sephadexbehandlung wurde Faktor VII an Al(OH)_3 adsorbiert. Al(OH)_3 wurde 35 einem Waschprozeß und einem Faktor VII-Elutionsprozeß bei erhöhter Ionenstärke unterworfen. Das Faktor VII-hältige

Eluat wurde dialysiert und mit dem dialysierten partiellen Prothrombinkomplex-Präparat, hergestellt nach Beispiel 3, in solchem Verhältnis gemischt, daß die Gerinnungsaktivitäten der Faktoren II, IX, X und VII ungefähr gleich 5 hoch waren.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Die in beschriebener Weise erhaltene Lösung des totalen 10 Prothrombinkomplexes wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,07 eingestellt. Ge 15 schlossene Behälter mit den gefriergetrockneten totalen Prothrombinkomplex-Proben - mit und ohne Virus - wurden bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des 20 Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

25

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Die Bestimmung der Faktor IX-Aktivität erfolgte durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor IX-Mangelplasma und Bestimmung der aktivierte partiellen Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die Faktor IX-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Faktor IX-Aktivität der erhitzten Probe und der Faktor IX-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind aus der Tabelle V zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß nach einer Behandlungszeit von 3 h die Nachweisgrenze 10 des Virus erreicht wurde, wobei die Restaktivität im wesentlichen erhalten blieb.

Beispiel 5:

a) Herstellung einer FEIBA-Präparation

15

Eine FEIBA enthaltende Präparation wurde aus frisch gefrorenem menschlichem Zitratplasma nach der in der AT-PS 368.883 beschriebenen Methode hergestellt, indem nach Auftauen des Plasmas, Abtrennen des dabei anfallenden Kryopräzipitates und Generieren der FEIBA-Aktivität die Gerinnungsfaktoren durch Adsorption an einen Ionenaustauscher und Elution gewonnen wurden.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

25

Die erhaltene FEIBA-hältige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete 30 FEIBA-Konzentrat wurde auf verschiedene Wassergehalte, u.zw. auf 0,07, 0,08 bzw. auf einen Äthanolgehalt von 0,10 eingestellt und in geschlossenen Behältern bei verschiedenen Temperaturen, nämlich 60°C und 90°C, verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und 35 zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und zur Bestimmung

der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

5 Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

10 Die Bestimmung der FEIB-Restaktivität erfolgte, wie in der AT-PS 350.726 beschrieben, durch Zusatz der zu testenden Probe zu einem Faktor VIII-Inhibitorplasma und Bestimmung der aktivierte partielle Thromboplastinzeit (1-Stufen-Test). Die FEIB-Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus 15 der FEIB-Aktivität der erhitzten Probe und der FEIB-Aktivität der entsprechenden nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

20 Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

25 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle VI zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit sowohl vom Wassergehalt als auch von der Inaktivierungstemperatur abhängig ist. Bei einem Wassergehalt von 0,07 und einer Temperatur von 60°C wird die Nachweisgrenze des Virus nach 3 h und 30 bei einem Wassergehalt von 0,08 und einer Temperatur von 90°C wird die Nachweisgrenze schon nach 0,2 h erreicht. Die Restaktivität ist in allen Fällen zufriedenstellend.

35 Im Vergleich dazu ist in Tabelle VIa ein Vergleichsbeispiel angegeben, wobei eine FEIBA-Probe in "trockenem Zustand" mit einem Wassergehalt von 0,009 bei 60°C behan-

delt worden ist. Der Virustiter ist selbst nach 30 h Behandlung noch mit 1,7 relativ hoch.

Die Inaktivierung einer nach diesem Beispiel hergestellten
5 FEIBA-Präparation wurde zusätzlich an einem zweiten Mo-
dellvirus, nämlich an Hundehepatitis-Virus, geprüft, wobei
das gefriergetrocknete FEIBA-Konzentrat auf einen Wasser-
gehalt von 0,07 eingestellt wurde und die Behandlungs-
10 temperatur 60 bzw. 80°C betrug. Die nach erfolgter Hitze-
behandlung gemessenen Virustiter sind der Tabelle VII zu
entnehmen. Der Titer des Hundehepatitis-Virus wurde durch
Bewertung des zytopathischen Effektes auf sensitive MDCK-
15 Zellen in der Mikrotiterplatte bestimmt. Die Ergebnisse
wurden nach statistischer Behandlung der Aßwertung ent-
sprechend der Formel von Reed und Muench als Logarithmus
TCID₅₀ ausgedrückt (Reed J.L. and H. Muench; Amer.J.Hyg.
27, 493, (1938)). Aus der Virustiterbestimmung ergab sich,
daß bei beinem Wassergehalt von 0,07 und einer Temperatur
von 60°C die Nachweisgrenze des Virus nach 1 h, bei einer
20 Temperatur von 80°C schon nach 0,1 h erreicht wurde.

In der Tabelle VIIa ist wieder ein Vergleichsbeispiel
angegeben, wobei die Behandlung in "trockenem Zustand",
erfolgte, mit dem Ergebnis, daß noch nach 30 h Behand-
25 lungenzeit die Inaktivierung unzureichend war.

In Fig. 3 sind in gleicher Darstellung wie in Fig. 1 die
Virusinaktivierungskurven und die Restaktivitäten nach
diesem Beispiel veranschaulicht.

30

Beispiel 6:

a) Herstellung einer Immunglobulin-hältigen Präparation

Eine Immunglobulin-hältige Präparation wurde nach der
35 von Oncley et al. im Journal of Amer.Chem.Soc., 71, 541-
550 (1949) beschriebenen Alkohol-Fraktionierungsmethode

aus menschlichem Plasma gewonnen. Die Lösung enthielt 100 mg Protein, 14 mg Glycin und 1,9 mg NaCl pro ml.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

5

Die erhaltene wässrige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Immunglobulinkonzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,054 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und zur Bestimmung der molekularen Integrität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

20

c) Bestimmung der molekularen Integrität an virusfreien Proben

25

Die Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Protein zusammensetzungen der erhitzten und der nicht erhitzten Probe, wobei die Trennung der Proteingemische im elektrischen Feld mittels c₁) Zelluloseacetat-Elektrophorese und c₂) SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte.

30

c₁) Mikrozonen-Elektrophorese auf Zelluloseacetat-Membran (Beckman-System)

35

Die Elektrophorese erfolgte nach dem Beckman-System (Microzone Electrophoresis Manual, Beckman Instructions 015-083630-C, 1977), wobei die Proben auf einer mit Veronal-

puffer (pH 8,6) äquilibrierten Zelluloseacetat-Membran aufgetragen und hierauf die Proteine bei 250 V (Stromstärke 3 - 4 mA pro Membran, Laufzeit 20 min) getrennt wurden. Nach Fixierung erfolgte Färbung mit Ponceau S, 5 Trocknung und densitometrische Auswertung der Membran.

c₂) SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung der mit Sodium-dodecylsulfat (SDS) beladenen Proteine erfolgte in einem 5 % Polyacrylamid-Gel nach der von Weber und Osborn in "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoreses", J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969) beschriebenen Methode. 10
15 Die Färbung der getrennten Proteine erfolgte nach der von Merril et al. in "Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins", Science 211, 1437 (1981) beschriebenen Methode mit Hilfe des Silberfärbungs-Reagensatzes der Firma BIO-RAD (Bulletin 1089). 20

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben. 25

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und das Ergebnis der molekularen Integritätsbestimmung sind aus der Tabelle VIII zu entnehmen. 30

Beispiel 7:

a) Herstellung einer C₁-Esterase-Inhibitor-Präparation

Eine C₁-Esterase-Inhibitor-hältige Präparation wurde aus 35 humanem Plasma nach der in Vox. Sang. 26, 118 (1974) beschriebenen Methode durch Adsorption an einem Anionen-

austauscher (DEAE-Sephadex) und anschließende Elution gewonnen. Nach Salzfällung zur Abtrennung unerwünschter Proteine wurde die gereinigte C₁-Esterase-Inhibitor-Präparation gefriergetrocknet.

5

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Eine aus dem Lyophilisat der C₁-Esterase-Inhibitor-Präparation erhaltene wässrige Lösung wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuerlich gefriergetrocknet. Das Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,10 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - 15 bei einer Temperatur von 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

20

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

25

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben
Die Aktivität des C₁-Esterase-Inhibitors wurde über seine Fähigkeit, die Hydrolyse des chromogenen Substrates Cl-1 (Pentapharm) durch C₁-Esterase zu hemmen, nach M. Kleindel, H. Lang, A. Philapitsch, G. Wöber, "Thrombosis and Haemostasis", 50, 244 (1983) bestimmt.

30

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

35

Diese Bestimmung erfolgte in der Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind aus Tabelle IX zu entnehmen.

5 Beispiel 8:

a) Herstellung einer Plasminogen-hältigen Präparation

Eine Plasminogen-hältige Präparation wurde nach der von D.G. Deutsch und E.T. Mertz in Science 170, 1095 (1970) beschriebenen Methode hergestellt. 50 ml Lysin-Sepharose wurden in einer Säule mit 0,1 M Phosphat, pH 7,4, äquilibriert. 340 ml Plasma wurden mit Wasser auf 640 ml verdünnt und die Säule wurde mit dieser Lösung beladen. Nach der Entfernung von Begleitproteinen durch Waschung mit einer 0,3 M Phosphatlösung (pH 7,4) wurde Plasminogen mit 0,2 M 6-Aminocapronsäure (pH 7,4) eluiert. Die Plasminogen-enthaltende Lösung wurde zur Entfernung von 6-Aminocapronsäure dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

20

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Eine aus dem Lyophilisat hergestellte wässrige Lösung des Plasminogens wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuerlich gefriergetrocknet. Das Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

35 Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in der Weise, daß eine Plasminogen-hältige Probe nach der Methode von K.C. Robbins, L.

5 Summaria, Methods in Enzymology, 19, 184-186 (1970) mit Streptokinase zu Plasmin aktiviert und die freigesetzte Plasminaktivität durch Quantitierung der aus Kasein freigesetzten TCA-löslichen Spaltprodukte bestimmt wurde.

10 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle X zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus bei zufriedenstellender Restaktivität nach 5 h erreicht wurde.

15

Beispiel 9:

a) Herstellung einer Plasmapräparation

Blut von gesunden Spendern wurde in einem Blutabnahmabeutel, worin Citrat-Trinatriumcitrat-Lösung enthalten war, abgenommen. Nachdem die Mischung sanft durchmischt wurde, wurde sie zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abdekantiert; 400 ml Plasma wurden mit 22 ml einer 15 % Glycinlösung, pH 3,6, gemischt.

25

b) Inaktivierung eines Modellvirus

Das mit Glycin gepufferte Plasma wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt, gefriergetrocknet und auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt. Geschlossene Behälter mit den Trockenplasmaproben - mit und ohne Virus - wurden bei 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

5

Diese Bestimmung erfolgte dadurch, daß die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) des Plasmas ermittelt wurde, indem die Gerinnungszeit eines Gemisches von je 0,1 ml Plasma, Kaolin/Phospholipid-Suspension und 0,025 10 molarem Calciumchlorid gemessen wurde. Die Restaktivität einer erhitzten Probe wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der aPTT der nicht erhitzten Probe und der aPTT der entsprechenden erhitzten Probe.

15 d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

20 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität sind der Tabelle XI zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus bei zufriedenstellender Erhaltung der Restaktivität schon nach 0,3 h erreicht 25 wurde.

Beispiel 10:

a) Herstellung einer Fibrinogen- und Fibronectin-hältigen Präparation

30

Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und der Prothrombin-komplex-Komponenten aus menschlichem Plasma wurde der anfallende Überstand auf 0°C gekühlt und unter Rühren so viel Äthanol zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 0,08 35 (8%) erreicht wurde. Die Temperatur wurde auf -2°C und der pH-Wert auf 7,0 gestellt. Die Suspension wurde zentri-

fugiert und der erhaltene pastenartige Niederschlag, der
Fibrinogen und Fibronectin enthielt, so lange mit einer Citrat-Glukose,
pH 6,9 - gepufferten 6,5 %igen Äthanollösung gewaschen,
bis im Überstand nicht mehr als 0,5 mg Protein/ml nach-
5 weisbar waren. Das gereinigte Fibrinogen wurde eingefroren und gefriergetrocknet, um Äthanol zu entfernen.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

10 Eine wässrige Lösung des Lyophilisates wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und neuerlich gefriergetrocknet. Das Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei einer Temperatur von 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Bestimmung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.
15
20

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

25 c) Bestimmung der Restaktivität an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte
c₁) mit einem Wirksamkeits-Test (Thrombinzeit),
wobei die Wirksamkeit einer Fibrinogen-Lösung nach der
30 U-S- Pharmacopeia, 16. Revision (USP XVI, 1960), Seite
298, bestimmt wurde, indem eine Probe der Fibrinogenlösung mit Calciumchlorid und Thrombin gemischt und die Gerinnungszeit bestimmt wurde. Die Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quotienten aus der Gerinnungszeit der nicht erhitzten Probe und der Gerinnungszeit
35 der erhitzten Probe.

und

c₂) mit der Bestimmung des clottierbaren Proteins

Das clottierbare Protein einer Fibrinogenlösung wurde

nach der USP XVI, Seite 298 bestimmt, indem (1) der Ge-

5 samtproteingehalt der Fibrinogenlösung bestimmt wurde
(Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl) und (2) der Protein-
gehalt des nach Thrombinzusatz clottierten Fibrins nach
der gleichen Methode (Kjeldahl) bestimmt wurde. Der
Quotient aus dem Protein-Wert des Fibrins (2) und dem
10 Protein-Wert des Gesamtproteins (1) ergab das clottier-
bare Protein.

Die Restaktivität wurde berechnet durch Bildung des Quo-

tienten aus dem clottierbaren Protein der erhitzten Probe

15 und dem clottierbaren Protein der nicht erhitzten Probe.

d) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte in gleicher

20 Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter

und die nach der Behandlung noch vorhandene Restaktivität

sind der Tabelle XII zu entnehmen, woraus sich ergibt,

25 daß die Nachweisgrenze des Virus nach 5 h erreicht wurde,
wobei die Restaktivitäten nach den angegebenen Methoden
zufriedenstellend waren.

Beispiel 11:

30 a) Herstellung einer Albumin-hältigen Präparation

Zu 10 l menschlichem Blutplasma wurden bei einem pH-Wert

von 7,0 und einer Temperatur von -2°C 0,08 Äthanol zuge-

setzt, wobei ein Niederschlag, der Fibrinogen enthält,

35 ausfiel. Nach Abtrennen des Niederschlages wurde die
Äthanolkonzentration auf 0,25 erhöht und die Temperatur

auf -6°C gesenkt. Der ausfallende Niederschlag, der Immunoglobulin enthielt, wurde abgetrennt und die Äthanolkonzentration des Überstandes, bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von -8°C, auf 0,40 erhöht, wobei eine 5 weitere Fällung erfolgte. Der Niederschlag wurde abgetrennt und verworfen. Zur Ausfällung von Albumin wurde bei gleicher Temperatur der pH-Wert des Überstandes auf 10 5,4 gestellt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und einem weiteren Reinigungsschritt unterworfen, indem er in Wasser gelöst und die Äthanolkonzentration bei einem pH-Wert von 4,8 und einer Temperatur von -2°C auf 0,10 gestellt wurde. Das ausgefallene Globulin wurde abgetrennt und verworfen. Die Äthanolkonzentration des Überstandes wurde auf 0,40 erhöht, die Temperatur 15 auf -8°C gesenkt und der pH-Wert auf 5,1 gestellt. Der Niederschlag ist Albumin und wurde durch Zentrifugieren gesammelt und gefriergetrocknet.

b) Inaktivierung eines Modellvirus

20 Eine wässrige Lösung des Lyophilisates wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt und mit Hundehepatitisvirus in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete 25 Albuminkonzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,07 eingestellt und in geschlossenen Behältern - mit und ohne Virus - bei 60°C verschieden lang erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während 30 des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der molekularen Integrität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

35 Die Bestimmung des Virustiters erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 5 beschrieben. Die Bestimmung der molekularen Integrität, nämlich des Verhaltens in der Zelluloseacetat-Elektrophorese und SDS-Polyacrylamid-Gel-

Elektrophorese, erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 6 beschrieben.

5 c) Bestimmung des Wassergehaltes an virusfreien Proben

Diese Bestimmung erfolgte in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

10 Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die molekulare Integrität sind aus der Tabelle XIII zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß die Nachweisgrenze des Virus schon nach einer Stunde erreicht wurde und die molekulare Integrität gegenüber nicht erhitzten Kontrollproben keine Veränderung zeigte.

15

Beispiel 12:

Herstellung von Blutpräparationen unter Verwendung eines flüssigen Mediums, in dem sie unlöslich sind

20 Eine wie in Beispiel 1a) hergestellte Faktor VIII-Präparation wurde auf 50 mg Protein/ml eingestellt, mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet.

25 Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Präparat wurde auf einen Wassergehalt von 0,09 eingestellt. Mehrere Behälter mit den gefriergetrockneten Faktor VIII-Proben - mit und ohne Virus - wurden mit je 10 ml wassergesättigtem Chloroform (um den Wassergehalt der Proben nicht zu verändern) versetzt, verschlossen und 10 h lang bei 60°C erhitzt. Je drei Proben wurden vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

35 Vor der Bestimmung des Virustiters und der Restaktivität wurden die Proben vom Lösungsmittel durch Absaugen im

Vakuum befreit.

Die Bestimmung des Virustiters und des Wassergehaltes erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

5

Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter und die nach der Behandlung vorhandene Restaktivität sind der Tabelle XIV zu entnehmen, woraus sich ergibt, daß der Virustiter nach 3 h unter die Nachweisgrenze absank, während 10 die Restaktivität 0,85 betrug.

In gleicher Weise wurde die Inaktivierung von Hundehepatitisvirus in einer FEIBA- und einer partiellen Prothrombinkomplex-Präparation geprüft, wobei die FEIBA-Präparation nach Beispiel 5a) und die partielle Prothrombinkomplex-Präparation nach Beispiel 3a) hergestellt waren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte, wie in Beispiel 5 beschrieben. Die nach erfolgter Hitzebehandlung gemessenen Virustiter sind aus der Tabelle XIV zu entnehmen.

20

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von Blutprodukten beschrieben, wobei die erfindungsgemäße Inaktivierung angewendet wird, um etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrierbare Krankheitserreger unschädlich zu machen.

25

Beispiel 13:

Herstellung einer Faktor VIII-Präparation

30

100 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 10,5 l Trinatriumcitrat-Lösung, die 50 mg Natriumpentosansulfat/l und 30.000 Einheiten Aprotinin/l enthielt, gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen.

Durch Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 0,03 wurde die Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst, 5 gefriergetrocknet, auf einen Wassergehalt von 0,08 gebracht und während 10 h bei 60°C erhitzt. Die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung nach dem Erhitzungsvorgang er- gab eine Restaktivität von 0,92 (92 %) verglichen mit nicht erhitztem Material.

10

Zur Herstellung einer galenischen Zubereitung wurde das inaktivierte Pulver mit destilliertem Wasser unter Zusatz von Glycin-Trinatriumcitrat-NaCl so gelöst, daß eine Lösung mit 25 IE Faktor VIII pro ml, 10 g Glycin/l, 10 g 15 Trinatriumcitrat-2H₂O/l und 5 g Natriumchlorid/l resul- tierte. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Lösung sterilfiltriert, mit 20 ml pro Flasche in die End- behälter verfüllt und gefriergetrocknet. Die Faktor VIII- Aktivitätsbestimmung des gefriergetrockneten Materials 20 in Endbehältern ergab 480 IE Faktor VIII/Flasche.

Beispiel 14:

Herstellung einer Faktor VIII-Präparation nach Entfernung von während der Inaktivierung gebildeten Neoproteinen

25

46 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C auf- getaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in 960 ml einer Tri-Natriumcitrat- lösung bei 37°C gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 30 6,3 und die Temperatur auf +4°C gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und verworfen. Der Faktor VIII-hältige Überstand wurde ge- friergetrocknet, das Lyophilisat auf einen Wassergehalt von 0,075 (7,5 %) eingestellt und 10 h bei 60°C hitzein- 35 aktiviert, um etwa vorhandene vermehrungsfähige filtrier- bare Krankheitserreger, wie Hepatitisviren, zuverlässig

unschädlich zu machen. Die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung nach dem Erhitzen ergab eine Restaktivität von 0,95 (95 %) Faktor VIII im Vergleich zu nicht erhitztem Material.

5

Proben der nicht erhitzten und der erhitzten gefriergetrockneten Faktor VIII-Präparation wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese untersucht. Bei der nicht erhitzten Probe wurde das in Fig. 4 mit a bezeichnete Bandenmuster erhalten. Bei der erhitzten Probe ergab sich das in Fig. 4 mit b bezeichnete Bandenmuster, bei welchem die mit N_1 , N_2 und N_3 bezeichneten Banden in Erscheinung traten, die dem Auftreten von Neoproteinen während der Inaktivierungshitzebehandlung zuzuschreiben sind. Diese Neoproteine sind erfundungsgemäß durch eine Nachbehandlung der erhitzten Faktor VIII-Präparationen zu entfernen. Die Nachbehandlung bzw. weitere Fraktionierung erfolgte durch Auflösen der erhitzten Faktor VIII-Präparation in 900 ml Wasser und Zugabe von Äthylalkohol bis zu einer Konzentration von 0,10. Dabei wurde eine Faktor VIII-hältige Fraktion ausgefällt, durch Zentrifugieren abgetrennt und in einem Glycin-Citrat-NaCl-Puffer gelöst. Die Lösung wurde in eine galenische Zubereitung übergeführt, wie in Beispiel 13 beschrieben.

25

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der gereinigten Fraktion ergab das in Fig. 4 mit d bezeichnete Bandenmuster: die Untersuchung des Überstandes der 0,10-Alkoholfällung ergab das mit c bezeichnete Bandenmuster. Daraus ist ersichtlich, daß die Neoproteine N_1 , N_2 und N_3 im Überstand der Alkoholfällung verblieben, während die gereinigte Faktor VIII-Präparation diese Banden nicht mehr enthielt. Bei der beschriebenen Alkoholfraktionierung werden auch andere Proteine entfernt. Die Faktor VIII-Aktivität in der fraktionierten Präparation ist im wesentlichen, nämlich zu 0,70, erhalten geblieben.

Die erfindungsgemäße Hitzeinaktivierungsbehandlung kann bis zu 100 h ausgedehnt werden, ohne die Aktivitäten zu verlieren. Die Stabilität wichtiger Gerinnungsfaktoren beim Erhitzen bis zu 100 h bei bestimmten, im Rahmen der 5 Erfindung einzuhaltenden Temperatur- und Wassergehalte ist aus Tabelle XV zu ersehen.

Beispiel 15:
Herstellung einer Faktor VIII-Präparation unter Verwen-
10 dung von Schutzgas

Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 1 hergestellte Faktor VIII-hältige Lösung wurde mit einer Sindbis-Virus-suspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virus- 15 freiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet.

Das gefriergetrocknete Faktor VIII-Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 (8 Gew.-%) eingestellt, durch dreimaliges Evakuieren auf 100 mbar und nachfolgendes 20 Begasen mit Luft, Stickstoff, Helium bzw. Argon in ver-schiedene "Atmosphären" gebracht und in geschlossenen Behältern bei einer Temperatur von 80°C verschieden lang erhitzt. Von jeder Variante wurden je drei Proben vor 25 dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Er-hitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität an Faktor VIII und des Wassergehal-tes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters, der Restaktivität an Fak-30 tor VIII und des Wassergehaltes erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben; die Resultate sind der Tabelle XVI zu ent-nehmen. Daraus ist ersichtlich, daß die Restaktivitäten bzw. Ausbeuten an Faktor VIII beim Erhitzen in einer Inert-gasatmosphäre (Stickstoff, Helium, Argon) wesentlich höher 35 sind als beim Erhitzen in Luft. Die Geschwindigkeit der Virusinaktivierung ist hingegen unabhängig von der Atmo-

sphäre, in der erhitzt wurde.

Beispiel 16:

Herstellung einer den partiellen Prothrombinkomplex enthaltenden Präparation unter Verwendung von Schutzgas

Eine in gleicher Weise wie in Beispiel 3 hergestellte Präparation, welche die Gerinnungsfaktoren II, IX und X enthielt, wurde mit einer Sindbis-Virussuspension in Zellkulturmedium TCM 199 bzw. mit virusfreiem TCM 199 versetzt und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Konzentrat wurde auf einen Wassergehalt von 0,08 eingestellt, durch dreimaliges Evakuieren auf 100 mbar und nachfolgendes Begasen mit Luft, Stickstoff, Helium und Argon in verschiedene "Atmosphären" gebracht und in geschlossenen Behältern bei einer Temperatur von 90°C verschieden lang erhitzt. Von jeder Variante wurden je drei Proben vor dem Erhitzen und zu bestimmten Zeiten während des Erhitzungsvorganges zur Messung des Virustiters einerseits und der Restaktivität an Faktor IX und des Wassergehaltes andererseits entnommen.

Die Bestimmung des Virustiters und des Wassergehaltes erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben, die Bestimmung der Restaktivität an Faktor IX erfolgte, wie in Beispiel 3 beschrieben.

Die Resultate sind der Tabelle XVII zu entnehmen. Daraus ist ersichtlich, daß die Restaktivitäten bzw. Ausbeuten an Faktor IX beim Erhitzen in einer Inertgasatmosphäre (Stickstoff, Helium, Argon) wesentlich höher sind als beim Erhitzen in Luft. Die Geschwindigkeit der Virusaktivierung ist hingegen unabhängig von der Atmosphäre, in der erhitzt wurde.

Faktor VIII-Präparation

Tabelle I

Wasser- gehalt	Temperatur °C	SindbisVirustiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen während						Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während				
		0	0,1	0,3	1	3	10	30 h	0,3	1	3	10
5	0,50	60	5,1	2,6	<1	<1	<1	<1	0,80	0,59	0,38	
	0,30	60	5,2	2,9	<1	<1			0,95	0,86	0,80	
	0,20	60	5,1	3,1	<1	<1			1,00	0,95	0,92	
	0,08	60	5,0	4,7	3,6	2,0	<1		1,00	1,00	1,00	
10	0,08	80	4,9	<1	<1	<1			0,97	0,89		

Tabelle I a)

0,015	60	3,7	3,7	2,7	<1	<1	1,00	1,00
0,006	60	4,1		3,4	2,9	1,4	<1	

Faktor VIII-Präparation

Tabelle II

Gehalt an Methanol 5	Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virusstiter (\log_{10})			Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während 30 h
			0	1	3	
0,10	0,005	60	4,8	4,9	3,5	<1,5
10						1,00

10

Tabelle IIa

0,005	60	5,1	5,3	4,6	3,6	2,1	1	1	1	1
-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	---	---

Faktor VIII-Präparation

Tabelle III

Gehalt an Mannit 5	Temperatur °C	Sindbis-Virusstiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen				Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während				
		0	1	3	10	30 h	1	3	10	30 h
0,10	0,002	60	6,6	5,6	5,0	4,0	<1	1,00	1,00	1,00
10										

Tabelle IIIa

15	0,002	60	6,4	6,4	5,9	4,0	2,2	1,00	1,00	1,00
----	-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------

präparation mit partieilem Pro-
chrombinkomplex

Tabelle IV

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Bakteriophagen T4-Virustiter (\log_{10} PFU) nach Erhitzen			Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während
		0	1	3	
5				10 h	
0,09	60	2,4	0	0	1,00 0,95 0,88

10

Tabelle IVa

0,004	80	2,5	2,3	2,4	2,0	1,00	1,00
0,004	90	2,6	2,7	2,7	2,0	1,00	1,00

Präparation mit totalem Pro-
thrombinkomplex

Tabelle V

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log ₁₀)			Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während	
		TCID ₅₀) nach Erhitzen während	0	0,3	1 h	1
0,07	60	6,1	5,2	4,8	3,3 <1	1,00 0,97

FEIBA-Präparation

Tabelle VI

Gehalt an Wasser	Äthanol °C	Sindbis-Virustiter (\log_{10} TCID ₅₀ nach Erhitzen während						Restaktivität FEIBA nach Erhitzen während								
		0	0,05	0,1	0,2	0,3	1	3	10	30 h	0,1	0,3	1	3	10	30 h
0,007	0,10	60	3,9													
0,07	60	4,1	3,8													
0,08	90	4,7	2,9													

10

- 39 -

0159311

Tabelle VIIa

0,009	60	5,2	4,8	4,8	4,6	1,7	1,3	1,0	1,0	1,0
-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FEIBA-Präparation

Tabelle VII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter (log ₁₀			Restaktivität FEIBA				
		TCID ₅₀) nach Erhitzen während	0	0,1	0,3	1	3	10	30 h
0,07	60	3,9	2,6	2,1	<1	<1			
0,07	80	3,5	<1	<1	<1	<1			

5

10

Tabelle VIIa

0,015	60	4,8	4,2	4,0	3,4	2,3	1,00	1,00
-------	----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------

Immunglobulin-hältige Präparation

Tabelle VIII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen während					molekulare Integrität
		0	1	2	4	10 h	
5							
0,054	60	6,4	5,5	4,4	3,0	<1	keine Veränderung gegenüber nicht erhitzen Kontrollproben
10							

10

C₁-Esterase-Inhibitor-Präparation

Tabelle IX

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen während					Restaktivität (chromogenes Substrat) nach Erhitzen während
		0	1	2	4	10 h	
15							
0,10	60	6,4	5,0	4,5	3,0	<1	0,99 0,98 0,96 0,93

15

Plasminogen-hältige Präparation

Tabelle X

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen während			Restaktivität Plasminogen nach Erhitzen während		
		0	1	2	5 h	1	2
0,058	60	5,6	4,5	3,7	<1,5	-	0,94

5

Plasmapräparation

Tabelle XI

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀) nach Erhitzen während			Restaktivität aPTT nach Erhitzen während		
		0	0,3	1 h	0,3	1	h
0,052	60	5,4	<1	<1	-	0,97	0,91

Fibrinogen- und Fibronectin-
hältige Präparation

Tabelle XII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virustiter (\log_{10} TCID ₅₀) nach Erhitzen während clottierbares Protein (c ₂) nach Erhitzen während	Restaktivität: Thrombinzeit (c ₁)			
			0	1	2	5 h
0,063	60	4,9 2,9 1,5 <1	c ₁ 0,80	0,80	0,70	
			c ₂ 0,91	0,85	0,73	

Albumin-hältige Präparation

Tabelle XIII

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundehepatitis-Virustiter (\log_{10} TCID ₅₀) nach Erhitzen während 0 1 2 4 h	molekulare Integrität			
			0	1	2	4 h
0,07	60	3,2 <1 <1 <1				keine Veränderung gegenüber nicht erhitzen Kontroll- proben

Faktor VIII-Präparation

Tabelle XIV

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Sindbis-Virusstiter ($\log_{10}^{TCID_{50}}$)			Restaktivität Faktor VIII nach Erhitzen während 3 h
		0	0,3	1	
0,09	60	3,9	4,6	2,9	<1

FEIBA-Präparation

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundeleberatitis-Virusstiter ($\log_{10}^{TCID_{50}}$)			Restaktivität FEIBA nach Erhitzen während 3 h
		0	0,1	0,3	
0,08	60	2,9	2,0	2,0	<1

Partielle Prothrombinkomplex-Präparation

Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Hundeleberatitis-Virusstiter ($\log_{10}^{TCID_{50}}$)			Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während 3 h
		0	0,1	0,3	
0,08	60	2,6	1,8	<1	<1

Stabilität der Gerinnungsfaktoren

Tabelle XV

5	Produkt	Gehalt an Wasser	Temperatur °C	Restaktivität nach Erhitzen während 30 100 h		
				10	30	100 h
10	Faktor VIII-Kon- zentrat	0,08 0,07	60 60	0,94 0,95	0,85 0,82	0,47 Faktor VIII 0,67 FEIBA
	Totaler Prothrombin- komplex	0,07	60	0,91	0,79	0,38 Faktor IX
	Partieller Prothrom- binkomplex	0,09	60	0,88	0,73	0,33 Faktor IX

Faktor VIII-Präparation

Tabelle XVI

Wasser- sgehalt	Tempera- tur °C	Atmo- sphäre	Sindbis-Virustiter (logTCID ₅₀)			Restaktivität nach Erhitzen während			Faktor VIII
			0	0,3	1	3	10 h	1	
0,08	80	Luft	4,8	<1	<1	<1	<1	0,85	0,53
0,08	80	Stick- stoff	5,0	<1	<1	<1	<1	0,95	0,83
0,08	80	Helium	4,7	<1	<1	<1	<1	0,97	0,85
0,08	80	Argon	4,9	<1	<1	<1	<1	0,98	0,85

Präparation mit partiellem Prothrombinkomplex

Tabelle XVII

5 Wasser- gehalt	Tempera- tur °C	Atmo- sphäre	Sindbis-Virustiter (TCID50) nach Erhitzen während				Restaktivität Faktor IX nach Erhitzen während			
			0	0,3	1	3	10 h	1	3	10 h
0,08	90	Luft	4,7	<1	<1	<1	<1	0,63	0,30	0,07
0,08	90	Stick- stoff	4,9	<1	<1	<1	<1	0,82	0,55	0,22
0,08	90	Helium	5,1	<1	<1	<1	<1	0,75	0,47	0,14
15 0,08	90	Argon	4,8	<1	<1	<1	<1	0,70	0,42	0,12

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserregern in Blutprodukten unter Anwendung erhöhter Temperatur, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte in feuchtem oder in festem Zustand in Gegenwart von anorganischen oder organischen hydroxylgruppenhältigen Verbindungen mit einer H⁺-Dissoziationskonstante von <10⁻¹¹ bei einer Temperatur im Bereich bis zu 121°C hitzebehandelt werden, wobei die Konzentration der hydroxylgruppenhältigen Verbindungen größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%) ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die vermehrungsfähigen filtrierbaren Krankheitserreger Hepatitis-Viren oder unbekannte Überträger von AIDS (acquired immune deficiency syndrome) sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte während einer Dauer von 1 s bis 100 h erhitzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß als hydroxylgruppenhältige Verbindungen Wasser, Methanol, Äthanol oder Mannit eingesetzt werden, wobei die Konzentration dieser Verbindungen größer als 0,05 bis kleiner als 0,40 ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hitzebehandlung an Präparationen, die 0,06 bis 0,30 Wasser enthalten, bei einer Temperatur von 50 bis 90°C durchgeführt wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hitzebehandlung der Blutprodukte in

Gegenwart eines sauerstofffreien inerten Schutzgases, vorzugsweise Stickstoff, und allenfalls in Gegenwart von sauerstoffbindenden Substanzen durchgeführt wird.

5 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte in einem flüssigen Medium, in dem sie unlöslich sind, hitzebehandelt werden.

10 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als flüssiges Medium Chloroform oder Essigsäure-äthylester verwendet wird.

15 9. Abgeänderte Ausführungsform nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte mit hydroxylgruppenhältigen gasförmigen Verbindungen behandelt werden, mit der Maßgabe, daß in den Blutprodukten die Konzentration der hydroxylgruppenhältigen Verbindungen von größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als 0,40 (40 Gew.%) erreicht wird.

20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Blutprodukte in festem Zustand mit Wasserdampf von einem Druck bzw. Partialdruck zwischen 0,1 und 2 bar behandelt werden.

25 11. Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma oder Mischungen einzelner Blutprodukte, unter Anwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung in einer beliebigen Stufe des Herstellungsverfahrens vorgenommen wird, worauf gegebenenfalls die Blutprodukte in eine galenische Zubereitung übergeführt werden.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches an eine Matrix kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist.

5

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Blutprodukt verwendet wird, welches auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, aufgebracht ist.

10

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine fibrinogenhältige Komposition verwendet wird, welche auf einen gewebekompatiblen Träger, wie ein Kollagenvlies, aufgebracht ist.

15

15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hitzeinaktivierten Blutprodukte durch weitere Fraktionierungsmaßnahmen von während der Hitzeinaktivierung allenfalls gebildeten Neoproteinen oder Neoantigenen befreit werden.

20

16. Blutprodukt, ausgewählt aus Enzymen, Proenzymen, einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobulinen, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin und Plasma, hergestellt durch Fraktionierungsmaßnahmen, dadurch gekennzeichnet, daß in einer beliebigen Stufe des Fraktionierungsverfahrens die Blutproduktkomposition in Gegenwart von hydroxylgruppenhältigen Verbindungen mit einer H^+ -Dissoziationskonstante von $< 10^{-11}$ bei einer Temperatur im Bereich bis zu $121^{\circ}C$, vorzugsweise im Bereich von 50 bis $121^{\circ}C$, hitzebehandelt worden ist, wobei die Konzentration der hydroxylgruppenhältigen Verbindungen größer als 0,05 (5 Gew.%) und kleiner als 0,70 (70 Gew.%), vorzugsweise kleiner als 0,40 (40 Gew.%), ist.

0159311

- 51 -

17. Galenische Zubereitung enthaltend das Blutprodukt
nach Anspruch 16.

0159311

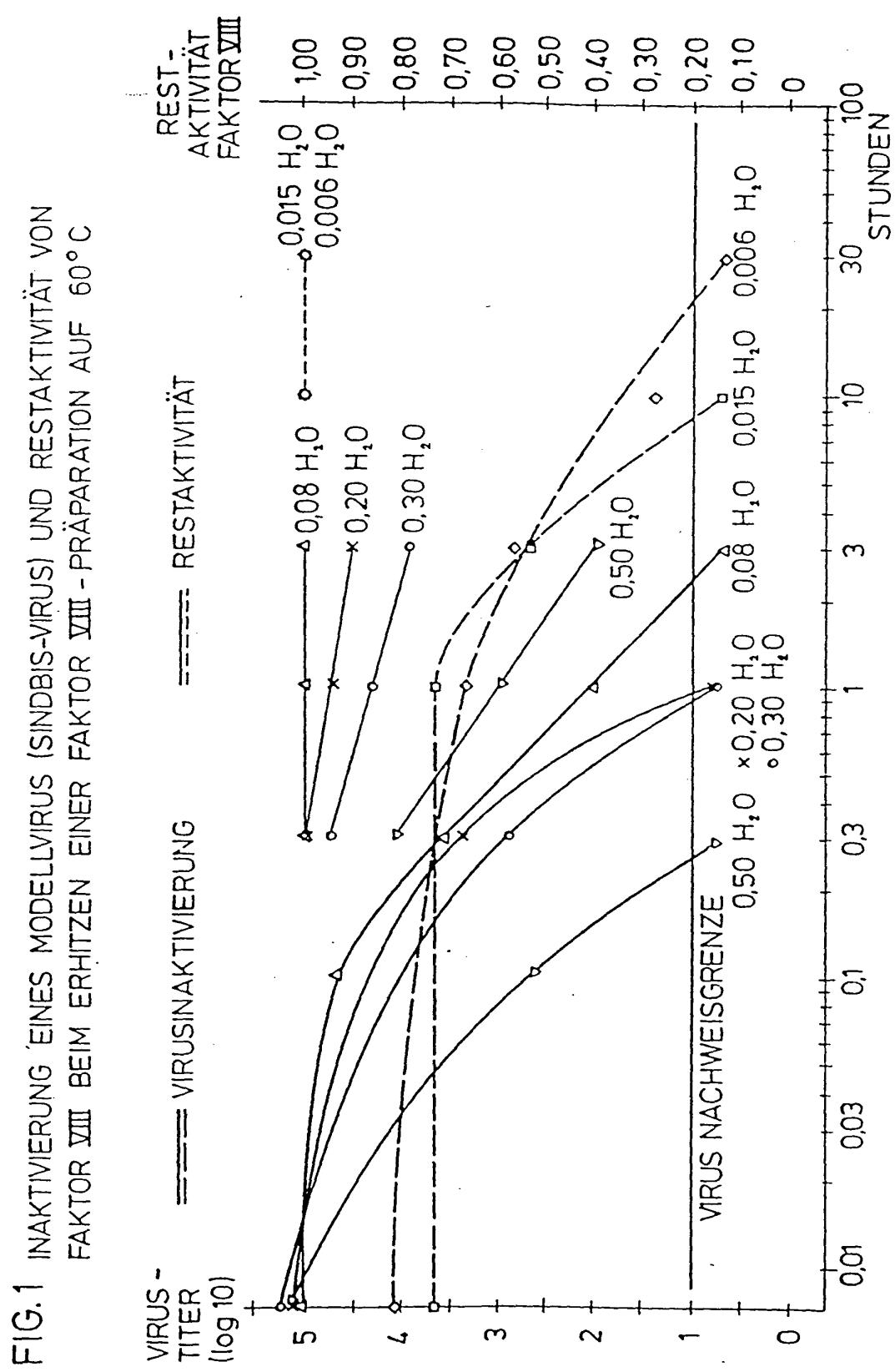
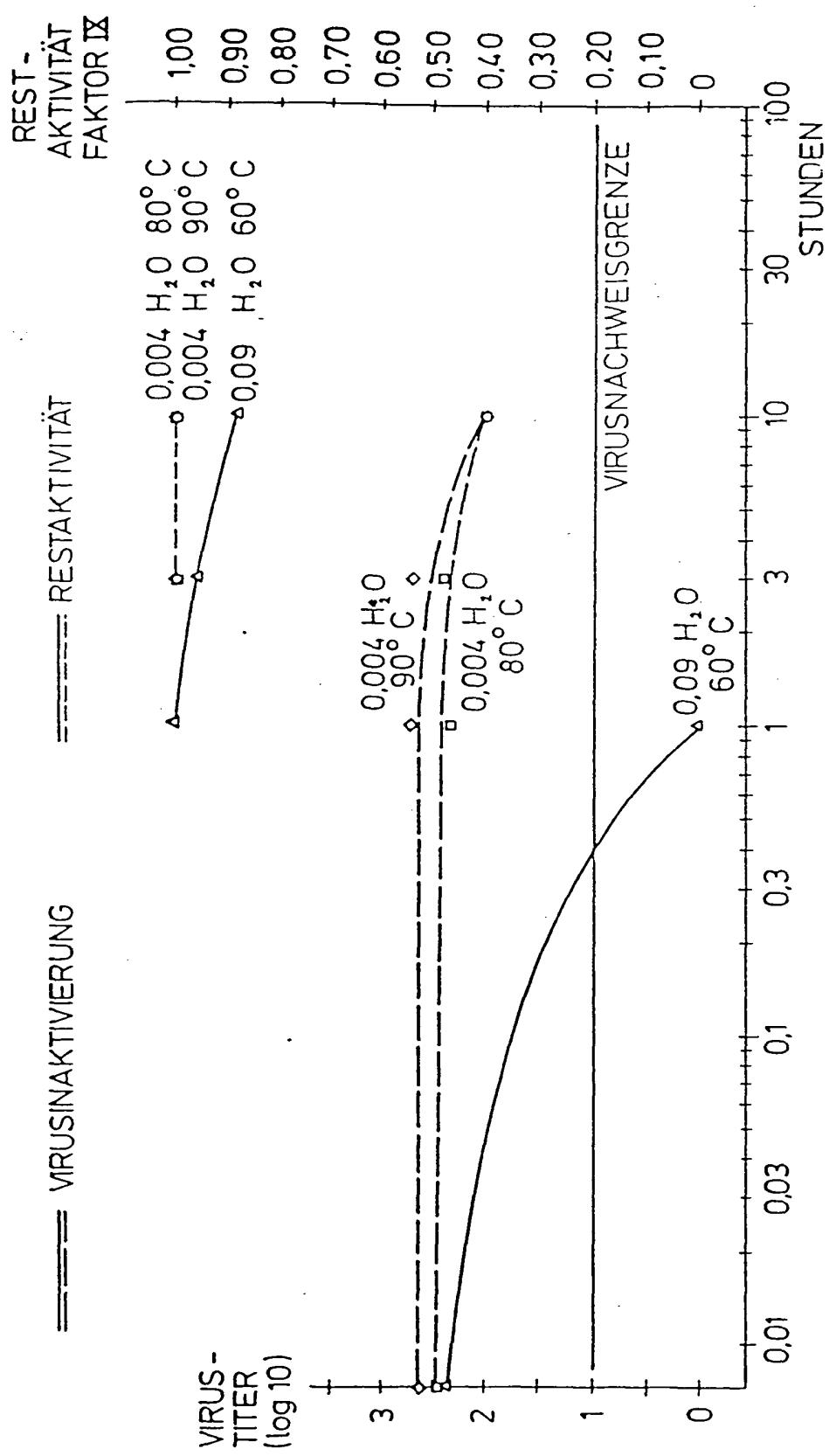


FIG. 2 INAKTIVIERUNG EINES MODELLVIRUS (BAKTERIOPHAGE T4) UND RESTAKTIVITÄT VON FAKTOR IX BEIM ERHITZEN EINER PARTIELLEN-PROTHROMBINKOMPLEX-PRÄPARATION



0159311

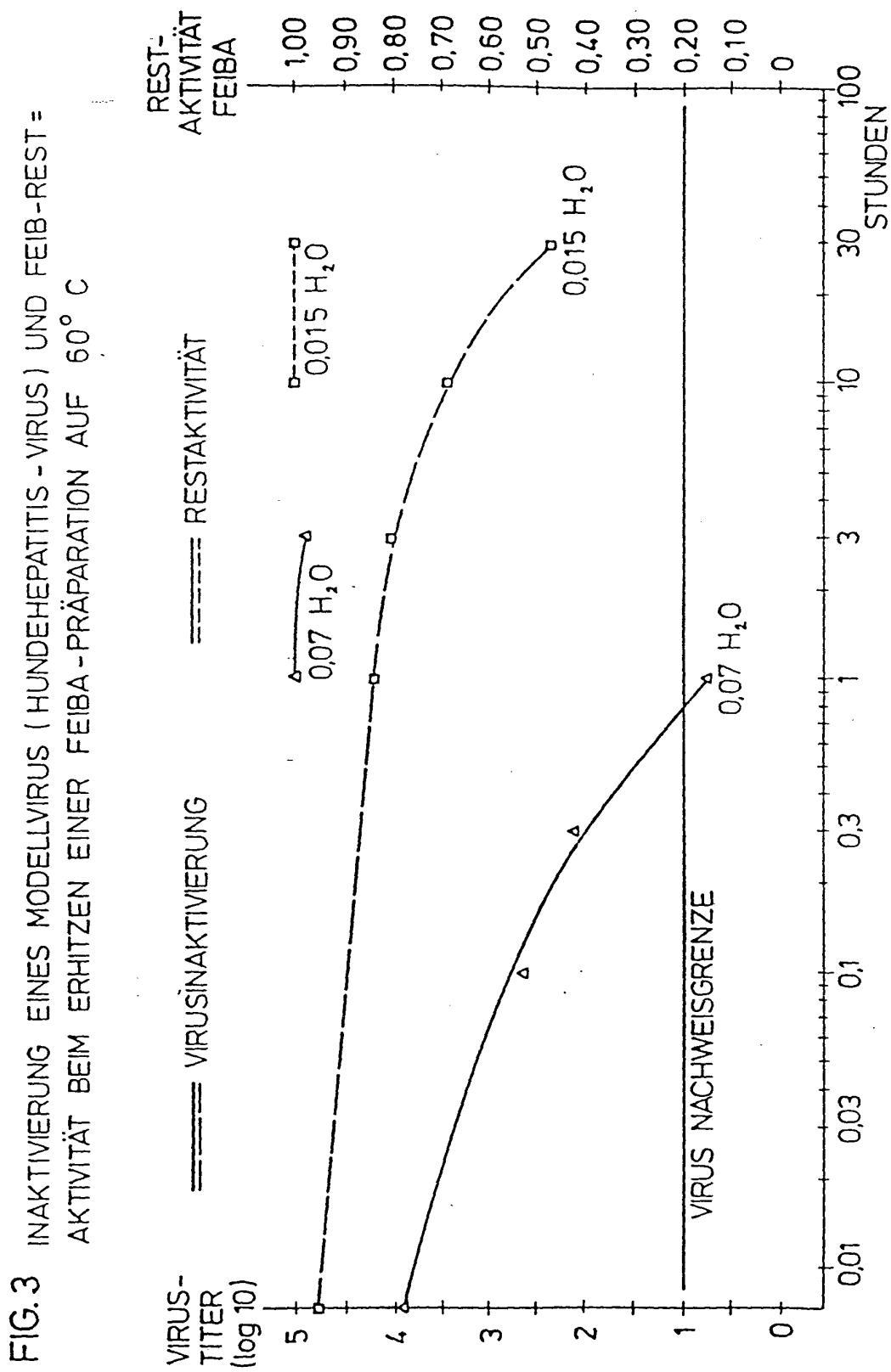
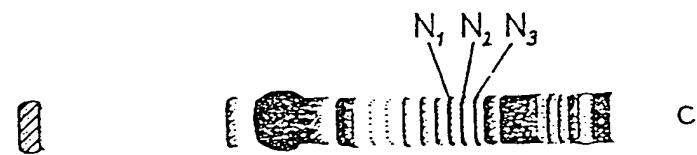
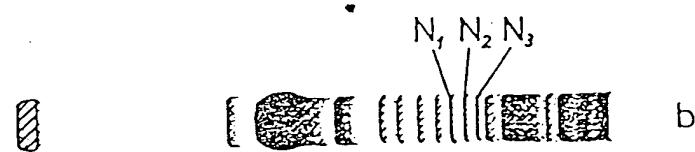


FIG. 4





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE												
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)									
D, X	WO-A-8 203 871 (BAXTER TRAVENOL LABORATORIES, INC.) * Seite 6, Zeilen 11-15; Ansprüche 1-16, 33 *	1-4, 6- 9, 12- 15, 17	A 61 L 2/04 A 61 K 35/16									
Y	---	11, 16										
D, Y	EP-A-0 094 611 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) * Ansprüche 1-62 *	11, 16										

			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)									
			A 61 L 2/04									
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort DEN HAAG</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche 02-08-1985</td> <td style="width: 34%;">Prüfer PELTRE CHR.</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 02-08-1985	Prüfer PELTRE CHR.	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 02-08-1985	Prüfer PELTRE CHR.										
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze												
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument												